

PRESERVATIVE FOR MICROORGANISM

Patent number: JP7111887
Publication date: 1995-05-02
Inventor: YANAGIMOTO YUKIO; others: 03
Applicant: YUKIO YANAGIMOTO; others: 01
Classification:
- international: C12N1/04; C12N11/06; C12N11/10
- european:
Application number: JP19930263797 19931021
Priority number(s):

Abstract of JP7111887

PURPOSE: To provide a preservative for microorganism capable of easily preserving a large amount of microorganism over a long period (for example several months) at room temperature to enable easy transportation of a large amount of microorganism.

CONSTITUTION: Microorganisms are held on a surface of a plurality of gelatinized water-absorbing resin particles. The water-absorbing resin particles are gelatinized and swollen by water absorption to keep a closely contacting state. The microorganisms are encircled by the gelatinized and swollen water-absorbing resin particles and, accordingly, shielded from oxygen in air and protected from drying.

~~~~~  
Data supplied from the **esp@cenet** database - Patent Abstracts of Japan

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-111887

(43) 公開日 平成7年(1995)5月2日

| (51) IntCl. <sup>6</sup>       | 識別記号 | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------------|------|---------|-----|--------|
| C 1 2 N 1/04<br>11/06<br>11/10 |      | 7236-4B |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平5-263797

(22) 出願日 平成5年(1993)10月21日

(71) 出願人 391054198

柳本 行雄

大阪府大阪市西区北堀江4丁目2-40-219

(71) 出願人 000004628

株式会社日本触媒

大阪府大阪市中央区高麗橋4丁目1番1号

(72) 発明者 柳本 行雄

大阪府大阪市西区北堀江4丁目2番40-219号

(74) 代理人 弁理士 原 謙三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微生物保存剤

(57) 【要約】

【構成】 ゲル化した複数の吸水性樹脂粒子の表面に微生物が保持されている。上記吸水性樹脂粒子は、吸水することによりゲル化して膨潤し、互いに密着状態とされている。このため、微生物は、その周囲がゲル化して膨潤した吸水性樹脂粒子により取り囲まれているので、空気中の酸素から遮断されると共に乾燥から保護される。

【効果】 微生物をその活性を維持したまま、長期間

(例えば数カ月間) にわたって常温で簡便にかつ多量に保存することが可能となる。また、多量の微生物を容易に運搬することが可能となる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】ゲル化した複数の吸水性樹脂粒子の表面に微生物が保持され、かつ、上記吸水性樹脂粒子が互いに密着状態とされていることを特徴とする微生物保存剤。

【請求項2】上記吸水性樹脂粒子全体を酸素から遮断する遮断材を備えていることを特徴とする請求項1記載の微生物保存剤。

【請求項3】上記微生物の大きさが1ミクロン以上であることを特徴とする請求項1または2記載の微生物保存剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、微生物をその活性を維持したまま保存する微生物保存剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】従来より、微生物の保存方法として、例えば凍結乾燥、冷凍保存、冷蔵保存等の低温で保存する方法が知られている。ところが、これら方法は、少量の微生物を保存するには適しているものの、多量の微生物を保存するには低温にするためのエネルギーコストが高くなり、その工程および操作が煩雑となる。また、常時、低温状態で取り扱わなければならないため、例えば運搬等が不便である。従って、上記の保存方法は、工業的並びに商業的規模で実施するのに適した方法ではない。

【0003】そこで、近年、多量の微生物を常温で保存するための微生物保存剤が種々検討されている。例えば、特公平 1-30476号公報には、微生物を分散させた水分散液と吸水性樹脂とを攪拌混合して吸水性樹脂に微生物を含む上記水分散液を吸収させた後、この吸水性樹脂を多価金属塩溶液と接触させ、水の放出および架橋反応を行わせることにより得られる微生物保存剤（上記公報においては固定化微生物と称されている）が示されている。上記の微生物保存剤は、吸水性樹脂内部の細孔に微生物を閉じ込めることにより固定化しているので、微生物を常温で保存することが可能となっている。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、微生物を閉じ込める吸水性樹脂内部の細孔の大きさは、通常1ミクロン程度であり、従って、上記従来の微生物保存剤は、保存可能な微生物の大きさが1ミクロン以下に限定されるという問題点を有している。また、上記従来の微生物保存剤は、微生物を吸水性樹脂内部の細孔に閉じ込める際に、吸水性樹脂を多価金属塩溶液と接触させ、水の放出および架橋反応を行わなければならない。また、反応後に多価金属塩を除去するために吸水性樹脂を水洗する必要がある。製造工程および操作が煩雑となると共に、製造に時間がかかるという問題点も有している。

【0005】本発明の目的は、上述した問題点を解決

し、簡単な操作でしかも時間をかけずに低コストで製造することができ、微生物をその活性を維持したまま、常温で簡便にかつ多量に保存することが可能な微生物保存剤を提供することにある。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本願発明者らは、微生物をその活性を維持したまま、常温で簡便にかつ多量に保存することが可能な微生物保存剤について鋭意検討した結果、ゲル化した複数の吸水性樹脂粒子の表面に微生物を保持し、これら吸水性樹脂粒子を互いに密着させることにより、微生物が長期間にわたって保存されることを見い出すと共に、上記吸水性樹脂粒子全体を遮断材で酸素から遮断することにより、より一層安定的に微生物が保存されることを確認して、本発明を完成させるに至った。

【0007】即ち、本発明は、ゲル化した複数の吸水性樹脂粒子の表面に微生物が保持され、かつ、上記吸水性樹脂粒子が互いに密着状態とされていることを特徴としている。また、上記吸水性樹脂粒子全体を酸素から遮断する遮断材を備えていることを特徴としている。また、上記微生物の大きさが1ミクロン以上であることを特徴としている。

【0008】以下に本発明を詳しく説明する。

【0009】本発明において用いられる吸水性樹脂は、自重の10～1000倍の純水を吸収する吸水能（＝最大に吸水したときの水の重量／吸水性樹脂の重量）を有するものであれば、特に限定されるものではない。従って、本発明においては、アニオン性、ノニオン性、カチオン性等の親水性官能基を有する親水性架橋重合体を使用することができる。具体的には、例えば、カルボキシメチルセルロースの架橋物、澱粉-アクリロニトリルグラフト共重合体の加水分解物、澱粉-アクリル酸グラフト共重合体の中和物、ポリ（メタ）アクリル酸塩重合体の架橋物、ポリアクリル酸の部分中和物の架橋物、イソブチレン-無水マレイン酸共重合体の架橋物、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体の酸化物、アクリロニトリル共重合体若しくはアクリルアミド共重合体の加水分解物またはこれらの架橋物、スルホン基含有重合体の架橋物、ポリエチレンオキシドやポリエチレンイミンの架橋物等を挙げることができる。これら吸水性樹脂のうち、澱粉-アクリル酸グラフト共重合体の中和物、ポリアクリル酸の部分中和物の架橋物、およびスルホン基含有重合体の架橋物が好ましい。勿論、上記吸水性樹脂の市販品を使用することも可能である。上記吸水性樹脂は、吸水することによりゲル化して膨潤する。

【0010】吸水性樹脂は、通常入手可能な形状、例えば、球状、フレーク状、顆粒状、塊状、フィルム状、繊維状、ウェブ状、シート状等の何れの形状でも任意に使用できる。また、その大きさも特に限定されるものではない。さらに、前記吸水性樹脂が一体的に固着された不

3

織布等を使用してもよい。尚、説明の便宜上、本発明においては、上記の形状を一括して「粒子」と称し、以下、必要に応じて吸水性樹脂粒子と記すこととする。

【0011】本発明において保存可能な微生物は、特に限定されるものではないが、例えば、有用産物生産能を有する各種好気性微生物、および、従来より水処理等の種々の分野で広範囲に用いられている各種好気性菌が好ましい。具体的には、例えば、アシネトバクター属 (*Acinetobacter*)、カンジダ属 (*Candida*)、ノカルジア属 (*Nocardia*)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces*)、ニトロソモナス属 (*Nitrosomonas*)、アルトロバクター属 (*Arthrobacter*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*)、スポロトリチウム属 (*Sporotrichum*)、ロドコッカス属 (*Rhodococcus*)、フザリウム属 (*Fusarium*)、アクロモバクター属 (*Achromobacter*)、クロモバクテリウム属 (*Chromobacterium*)、マイコバクテリウム属 (*Mycobacterium*)等の好気性微生物を挙げることができる。これら微生物は単独で用いてもよく、勿論、2種類以上の微生物を混合した混合微生物を用いてもよい。また、保存可能な微生物の大きさは、特に限定されるものではないが、後述のように吸水性樹脂粒子の表面に微生物が保持されるように、1ミクロン以上が好ましい。

【0012】尚、一般に、微生物はその生物学的特性として、高等生物に見られない代謝能の強さと、細胞組織の非常な不安定さを備えており、また、周囲の環境に強く影響される。例えば好気性微生物においては、常温で酸素や多量の水が存在すると生長したり活動が活発となるものの、栄養分がないと短時間で死滅する。このため、好気性微生物をその活性を維持したままで長期間（例えば数カ月間）にわたって常温で保存するには、空気中の酸素や、乾燥から保護するために必要な水以外の過剰な水を除去することが必要となっている。

【0013】本発明において用いられる遮断材は、吸水性樹脂粒子全体を空気中の酸素から遮断することが可能なものであれば、特に限定されるものではない。具体的には、例えば、酸素を通さない各種合成樹脂製の容器や袋、フィルム等、および、各種金属製の容器等を挙げることができる。そして、遮断性をさらに向上させるために、これら容器や袋等の内部の空気を窒素等の不活性ガスで置換して密閉してもよく、また、いわゆる脱酸素剤を吸水性樹脂と一緒に封入してもよい。さらに、容器等に充填した吸水性樹脂の上部を、好気性微生物に対して毒性を全く及ぼさない例えば流動パラフィン等の有機物で覆ってもよい。勿論、これら3つの手段を併用することも可能である。

【0014】以下に、本発明にかかる微生物保存剤を製造する製造方法の一例を示すこととする。

【0015】先ず、保存を所望する例えば好気性微生物を水に分散させることにより、水分散液を調製する。この水分散液は、従来から行われているいわゆる液体培養

4

法を用いて得ることができる。尚、このように液体培養法を用いて水分散液を得た場合には、水分散液に微生物を培養する際に用いた各種成分が残留するが、これら各種成分は吸水性樹脂が吸水する際に樹脂内部に取り込まれるので、微生物の保存に悪影響を及ぼすおそれはない。

【0016】上記水分散液の単位体積当たりの微生物の個体数は、特に限定されるものではないが、1ml当たり $10^3$ 個以上が好ましい。水分散液1ml当たりの微生物の個体数が $10^3$ 個未満の場合には、吸水性樹脂粒子の表面に保持される単位面積当たりの微生物の個体数が少なくなり、保存効率が低下するので好ましくない。さらに、水分散液1ml当たりの微生物の個体数を $10^3$ 個以上にすると、微生物が吸水性樹脂粒子の表面に高密度で保持されるので、保存後、微生物の使用時において微生物を予備培養しなくとも直ちに使用することができ、好適である。

【0017】次に、このように調製された水分散液に吸水性樹脂粒子を混合する。この際、水分散液1重量部に対する吸水性樹脂の重量部は、微生物の保存安定性を考慮すれば、吸水性樹脂粒子がゲル化して膨潤し、かつ、膨潤した吸水性樹脂粒子が互いに密着するように、水分散液と吸水性樹脂との重量比を、1/1以上、100/1未満、好ましくは、9/1以上、100/1未満とするのが好適である。

【0018】以上のように、微生物を分散させた水分散液を調製し、この水分散液に吸水性樹脂粒子を混合するという簡単な操作を行うだけで、時間をかけずに低コストで微生物保存剤が得られる。そして、吸水性樹脂粒子の表面に保持された微生物は、吸水することによりゲル化して膨潤した吸水性樹脂粒子が互いに密着状態となるので、その周囲がこれら吸水性樹脂粒子により取り囲まれる。このため、微生物は、空気中の酸素から遮断されると共に乾燥から保護され、例えば仮死状態となって保存される。

【0019】尚、微生物は吸水性樹脂粒子の表面に保持されているので、例えば微生物を微生物保存剤から取り出すときには、微生物保存剤を水洗するだけで微生物と吸水性樹脂粒子とを分離することができる。

【0020】本発明の微生物保存剤により、例えば油分解や水処理、脱臭等の環境対策、アルコール醗酵やアミノ酸醗酵等の食品工業、クエン酸醗酵やイタコン酸醗酵等の化学工業等、各種用途に用いられる微生物をその活性を維持したまま、常温で簡便にかつ多量に保存することが可能となる。また、本発明の微生物保存剤を用いることにより、多量の微生物を容易に運搬することができる。

【0021】

【作用】上記の構成によれば、吸水性樹脂粒子の表面に保持された微生物は、吸水することによりゲル化して膨

潤した吸水性樹脂粒子が互いに密着状態となるので、その周囲がこれら吸水性樹脂粒子により取り囲まれる。このため、微生物は、空気中の酸素から遮断されると共に乾燥から保護される。従って、微生物をその活性を維持したまま、長期間（例えば数カ月間）にわたって常温で簡便にかつ多量に保存することが可能となる。また、多量の微生物を容易に運搬することが可能となる。

【0022】また、上記の構成によれば、吸水性樹脂粒子全体を酸素から遮断する遮断材を備えているので、より一層安定的に微生物を保存することが可能となる。

【0023】また、上記の構成によれば、1ミクロン以上の大きさの微生物をその活性を維持したまま、長期間にわたって常温で簡便にかつ多量に保存することが可能となる。

【0024】尚、上記構成の微生物保存剤は、例えば、微生物を分散させた水分散液を調製し、この水分散液に吸水性樹脂粒子を混合するという簡単な操作を行うだけで、時間をかけずに低コストで得られる。

【0025】以下、実施例および比較例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらにより何ら限定されるものではない。尚、以下の説明においては、特に断りのない限り、部は重量部を、%は重量%をそれぞれ表すものとする。

【0026】

【実施例】

【実施例1】液体培養法を用い、下記に示す成分を含有する水溶液に保存を所望する微生物としてアシネトバクターカルコアセチカス菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) を分散させることにより、1ml当たり  $3 \times 10^7$  個の菌数を有する水分散液を調製した。上記の成分は、オリーブ油 2.0%、硫酸アンモニウム 0.6%、リン酸二ナトリウム12水和物 0.6%、リン酸一カリウム 0.4%、硫酸マグネシウム7水和物 0.001%、硫酸第一鉄 0.001%、塩化カルシウム2水和物 0.001%、モルツ浸出液0.1%、および酵母抽出液 0.1%であり、水溶液のpHは 6.8であった。

【0027】上記のようにして調製した水分散液 100部に対し、吸水性樹脂（商品名：アクアリックCA、株式会社日本触媒製）3部を混合することにより、微生物保存剤を得た。

【0028】得られた微生物保存剤をポリプロピレン製の容器内に密閉し、常温で2カ月間保存した。その後、保存したアシネトバクターカルコアセチカス菌を用いて油脂分解試験を行ったところ、上記保存菌の油脂分解率は、保存前の同菌の油脂分解率と同等の値を示した。

【0029】また、得られた微生物保存剤をポリプロピレン製の容器内に入れ、内部の空気を窒素置換して密閉し、常温で4カ月間保存した。その後、保存したアシネトバクターカルコアセチカス菌を用いて油脂分解試験を行ったところ、上記保存菌の油脂分解率は、保存前の同

菌の油脂分解率と同等の値を示した。

【0030】〔実施例2〕液体培養法を用い、下記に示す成分を含有する水溶液に保存を所望する微生物としてトユロプシスカンジダ菌 (*Torulopsis candida*) を分散させることにより、1ml当たり  $3 \times 10^7$  個の菌数を有する水分散液を調製した。上記の成分は、オリーブ油 2.0%、硫酸アンモニウム 0.6%、リン酸二ナトリウム12水和物0.03%、リン酸一カリウム0.4%、硫酸マグネシウム7水和物 0.1%、硫酸第一鉄 0.001%、塩化カルシウム2水和物 0.001%、モルツ浸出液 0.1%、酵母抽出液 0.1%、ポリペプトン 0.1%、および硫酸マンガ4水和物 0.001%であり、水溶液のpHは 5.5であった。

【0031】上記のようにして調製した水分散液 100部に対し、吸水性樹脂（商品名：アクアリックCA、株式会社日本触媒製）3部を混合することにより、微生物保存剤を得た。

【0032】得られた微生物保存剤をポリプロピレン製の容器内に密閉し、常温で2カ月間保存した。その後、保存したトユロプシスカンジダ菌を用いて油脂分解試験を行ったところ、上記保存菌の油脂分解率は、保存前の同菌の油脂分解率と同等の値を示した。

【0033】また、得られた微生物保存剤をポリプロピレン製の容器内に入れ、内部の空気を窒素置換して密閉し、常温で4カ月間保存した。その後、保存したトユロプシスカンジダ菌を用いて油脂分解試験を行ったところ、上記保存菌の油脂分解率は、保存前の同菌の油脂分解率と同等の値を示した。

【0034】〔実施例3〕実施例1にて調製した水分散液25部と、実施例2にて調製した水分散液75部とを混合して得られた混合液 100部に対し、吸水性樹脂（商品名：アクアリックCA、株式会社日本触媒製）3部を混合することにより、微生物保存剤を得た。

【0035】得られた微生物保存剤をポリプロピレン製の容器内に密閉し、常温で2カ月間保存した。その後、保存したアシネトバクターカルコアセチカス菌およびトユロプシスカンジダ菌の混合菌を用いて油脂分解試験を行ったところ、上記保存混合菌の油脂分解率は、保存前の同混合菌の油脂分解率と同等の値を示した。

【0036】また、得られた微生物保存剤をポリプロピレン製の容器内に入れ、内部の空気を窒素置換して密閉し、常温で4カ月間保存した。その後、保存したアシネトバクターカルコアセチカス菌およびトユロプシスカンジダ菌の混合菌を用いて油脂分解試験を行ったところ、上記保存混合菌の油脂分解率は、保存前の同混合菌の油脂分解率と同等の値を示した。

【0037】〔比較例1〕実施例1にて調製した水分散液、および、実施例2にて調製した水分散液を、それぞれポリプロピレン製の容器内に密閉し、常温で保存したところ、保存開始後2日目に微生物の死骸と思われる沈殿物がこれら容器の底に生成し、アシネトバクターカル

コアセチカス菌、および、トユロプシスカンジダ菌は死滅した。

【0038】【比較例2】実施例1にて調製した水分散液、および、実施例2にて調製した水分散液を、それぞれポリプロピレン製の容器内に入れ、内部の空気を窒素置換して密閉し、常温で保存したところ、保存開始後4日目に微生物の死骸と思われる沈殿物がこれら容器の底に生成し、アシネトバクター・カルコアセチカス菌、および、トユロプシスカンジダ菌は死滅した。

【0039】上記実施例1・2・3および比較例1・2の結果から明らかなように、本発明にかかる微生物保存剤は、微生物をその活性を維持したまま、長期間にわたって常温で簡便に保存可能であることがわかる。

#### 【0040】

【発明の効果】上記の構成によれば、吸水性樹脂粒子の表面に保持された微生物は、吸水することによりゲル化して膨潤した吸水性樹脂粒子が互いに密着状態となるので、その周囲がこれら吸水性樹脂粒子により取り囲まれる。このため、微生物は、空気中の酸素から遮断される\*

\*と共に乾燥から保護される。従って、微生物をその活性を維持したまま、長期間（例えば数カ月間）にわたって常温で簡便にかつ多量に保存することが可能となる。また、多量の微生物を容易に運搬することが可能となる。

【0041】また、上記の構成によれば、吸水性樹脂粒子全体を酸素から遮断する遮断材を備えているので、より一層安定的に微生物を保存することが可能となる。

【0042】また、上記の構成によれば、1ミクロン以上の大きさの微生物をその活性を維持したまま、長期間にわたって常温で簡便にかつ多量に保存することが可能となる。

【0043】尚、上記構成の微生物保存剤は、例えば、微生物を分散させた水分散液を調製し、この水分散液に吸水性樹脂粒子を混合するという簡単な操作を行うだけで、時間をかけずに低コストで得られる。

【0044】従って、上記構成の微生物保存剤は、微生物の活性を維持したまま長期間にわたって常温で多量に保存するために好適に利用されるという効果を奏する。

フロントページの続き

(72)発明者 東 種彦  
大阪府大阪市住之江区南港中4丁目7番22  
-611号

(72)発明者 原田 信幸  
兵庫県姫路市網干区興浜字西沖992-1  
株式会社日本触媒姫路研究所内  
(72)発明者 阪野 公一  
東京都千代田区内幸町1丁目2番2号 株  
式会社日本触媒内